Regulation des immunstimulierenden tumorassoziierten Antigen 90K in Ovarialkarzinomzellen

M.		Widschwendter ^a
A.		Dreps ^b
C.	Clara	Natoli ^c
A.		Zeimet ^a
T.		Lang ^a
G.		Daxenbichler ^a
A.		Ullrich ^b
S.		Iacohelli ^c
C.		Marth ^a

^aUnivers.-Klinik f. Frauenheilk. Innsbruck (Vorst.: Prof. Dr. O. Dapunt) ^bMax Planck-Institut für Biochemie Martinsried, Deutschland ^cChair of Medical Oncology. University G.D'nnunzio, Chieti, Italy

Dr. Martin Widschwendter, Univers.-Klinik f. Frauenheilk., Anichstraße 35, A-6020 Innsbruck

Durch Immunisation von Mäusen mit konditioniertem Medium von humanen Mammakarzinomzellen konnte man einen Antikörper gewinnen, welcher ein Antigen mit der geschätzten Größe von 90-95 kDa erkannte. Dieses Protein – als 90K bezeichnet – konnte man sowohl im Serum gesunder Individuen, als auch in verstärktem Ausmaß im Serum von Patienten mit verschiedensten Tumorerkrankungen finden [1, 2]. Die genaue Funktion dieses Proteins war bis vor kurzem nicht bekannt; jüngste Daten lassen aber eine Rolle in der Tumor-Wirt-Beziehung als sehr wahrscheinlich erraten: 90K maximiert die Potenz natürlicher (NK) und Lymphokin aktivierter Killerzellen (LAK) Tumorzellen zu erkennen und zu lysieren. Diese Aktivitätssteigerung wird durch eine 90K induzierte, autokrin wirksame Interleukin-2 Sekretion in den immunkompetenten Zellen bewerkstelligt [3]. Wir studierten die Regulation der Expression dieses Proteins in 3 Ovarialkarzinomzelllinien (OVCAR-3, HTB-77 und SKOV-6).

Material und Methoden

Zellkultur: Etablierte humane Ovarialkarzinomzellen (NIH-Ov-car-3, HTB-77 und SKOV-6) wurden unter den üblichen Bedingungen kultiviert [4].

Bestimmung des 90K Proteins: Die 90K Konzentration im Überstand bzw. in den Zellen wurde mittels eines immunradio-metrischen Assays [5] bestimmt. Die Ergebnisse wurden als „arbitrary units“ (U)/10⁶ cells ausgedrückt.

Northern Blot: Gesamt RNA wurde mittels der Guanidin-Iso-thiocyanat-Methode gewonnen. 10 µg RNA wurde am Formaldehyd Agarose Gel aufgetrennt, auf Nylonmembranen übertragen und mit einer Digoxigenin-markierten 90K cDNA hybridisiert. Die Detektion erfolgte mittels eines Chemilumineszenz Systems.

Ergebnisse

90K wurde von allen drei untersuchten Ovarialkarzinomzelllinien sezerniert. Sowohl Interferon- α als auch Interferon- γ steigerten die Sekretion und die mRNA Expression von 90K.

Interessanterweise führt die Behandlung der Zellen mit Interferon- γ zu einer Depletion von intrazellulärem 90K wohingegen Interferon- α sowohl die intra-als auch extrazelluläre 90K-Protein-Konzentration erhöhte. Die Kombination mit TNF potenzierte die Wirkung von Interferon- γ bezüglich Proliferationshemmung und Steigerung der 90K mRNA Expression synergistisch. Dieser Synergismus gilt in einem verminderten Ausmaß auch für Interferon- α .

Diskussion

Es ist bekannt, daß Interferone essentiell für die direkte Aktivierung von Teilen des Immunsystems ist. Wir konnten zeigen, daß Interferone wahrscheinlich auch indirekt Immunzellen stimulieren: Interferon steigern in den Tumorzellen die 90K Expression; 90K induziert in NK und LAK Zellen die Sekretion von Interleukin-2, welches autokrin eben diesen Zellen zur maximalen Aktivität verhilft. Interferone modulieren gleichzeitig auch die Expression von Antigen auf der Zelloberfläche und führen über diesen parallelen Mechanismus zu einer effizienteren Erkennung und Destruktion maligner Zellen. Diese Ergebnisse bieten folgende mögliche klinische Perspektiven: Eine Steigerung der Expression von Tumormarkern auf der Zelloberfläche verbessert einerseits die Sensitivität und Spezifität von diagnostischen Tests zur Erkennung neoplastischer Läsionen.

Andererseits bietet ein verstärkter Antigenbesatz der Tumorzellen die Möglichkeit einer besseren Erkennung durch Toxin- oder Radionuklid – gekoppelter Antikörper und dadurch einer selektiven Zerstörung maligner Zellen.

Die Relevanz dieses neuen tumorassoziierten Antigens bzgl. Diagnose und Therapie von Malignomen ist Gegenstand laufender Untersuchungen.

Zusammenfassung

Das Antigen K90 gehört zur Gruppe der Tumor-assoziierten Antigene und wird sowohl von Tumorzelllinien als auch von Patienten mit Malignomen produziert. Die genaue Funktion dieses Proteins ist nicht bekannt; jüngste Daten lassen aber eine Rolle in der Tumor-Wirt Beziehung als sehr wahrscheinlich erachten: 90K steigert die

Zytotoxizität natürlicher (NK) und Lymphokin aktivierter Killerzellen (LAK). Wir studierten die Regulation dieses Proteins in 3 Ovarialkarzinomzelllinien. Sowohl Interferon- α als auch Interferon- γ steigerten die Sekretion und die mRNA Expression von 90K. Interferone steigern in diesem Modell nicht nur direkt die zytotoxische Aktivität von Immunzellen, sondern fördern höchstwahrscheinlich auch über diesen indirekten Mechanismus die spezifische Lyse von Tumorzellen. Die klinische Relevanz dieses 90K Proteins hinsichtlich Diagnose und Therapie, ist Gegenstand laufender Untersuchungen.

Literatur

Iacobelli S, Arno E, Sismondi P, Natoli C, Gentiloni N, Scambia G, Gai M, Cortese P, Benedetti-Panici P, Manusco S: Measurement of breast cancer associated antigen detected by monoclonal antibody SP-2 in sera of cancer patients. *Breast Cancer Res Treat* 11: 1988; 19-30.
Scambia G, Benedetti-Panici P, Baiocchi G, Perrone L, Iacobelli S, Manusco S: Measurement of a monoclonal antibody defined antigen (90K) in the sera of patients with ovarian cancer. *Anticancer Res* 8: 1988; 761-764.
Ullrich A, Sures I, D'Egidio M, Jallal B, Powell TJ, Herbst R, Dreps A, Azam M, Rubinstein M, Natoli C, Shawver LK, Schlessinger J, Iacobelli S: The secreted tumor-associated antigen 90K is a potent immune stimulator. *JBC* 1994. in press.

Marth C, Fuith LC, Böck G, Daxenbichler G, Dapunt O: Modulation of ovarian carcinoma tumor marker CA-125 by interferon-gamma. *Cancer Res* 49: 1989; 6538-6542. Natoli C, Dianzani F, Mazzotta F, Baiocchi E, Pierotti P, Antonelli G, Iacobelli S. 90K protein: a new predictor of disease progression in human immunodeficiency virus infection *J AIDS* 6: 1993; 370-375.

102

Widschwendter/Dreps/Natoli/Zeimet/Lang/ Daxenbichler/Ullrich/Iacobelli/Marth

Regulation des immunstimulierenden tumorassoziierten Antigen 90K in Ovarial-karzinomzellen